

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号  
特開2001-157581  
(P2001-157581A)

(43) 公開日 平成13年6月12日 (2001. 6. 12)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テーマコード* (参考)
C 1 2 N 9/98		C 1 2 N 9/98	4 B 0 5 0
C 1 1 D 3/386		C 1 1 D 3/386	4 H 0 0 3
7/42		7/42	

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 6 頁)

(21) 出願番号	特願平11-343349	(71) 出願人	000000918 花王株式会社 東京都中央区日本橋茅場町 1 丁目14番10号
(22) 出願日	平成11年12月 2 日 (1999. 12. 2)	(72) 発明者	生賀 裕 茨城県鹿嶋郡神栖町東深芝20 花王株式会社 社研究所内
		(72) 発明者	早川 直明 茨城県鹿嶋郡神栖町東深芝20 花王株式会社 社研究所内
		(74) 代理人	100068700 弁理士 有賀 三幸 (外 3 名)
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 複合酵素粒剤の製造法

(57) 【要約】

【解決手段】 プロテアーゼを含む2種以上の酵素を含有する1種又は2種以上の酵素粉末であって、少なくとも該プロテアーゼに分解されやすい方の酵素を含む酵素粉末中に該酵素の安定化剤を実質上均質に含有する酵素粉末を、水溶性の粒子を核として、水溶性有機バインダーを用いて造粒し、次いで水溶性又は水分散性被覆剤で被覆することを特徴とする複合酵素粒剤の製造法。

【効果】 こうして得られた複合酵素粒剤は、プロテアーゼを含む2種以上の酵素を含有するにもかかわらず、これらの酵素が失活せず長期間安定である。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 プロテアーゼを含む2種以上の酵素を含有する1種又は2種以上の酵素粉末であって、少なくとも該プロテアーゼに分解されやすい方の酵素を含む酵素粉末中に該酵素の安定化剤を実質上均質に含有する酵素粉末を、水溶性の粒子を核として、水溶性有機バイNDERを用いて造粒し、次いで水溶性又は水分散性被覆剤で被覆することを特徴とする複合酵素粒剤の製造法。

【請求項2】 プロテアーゼを含む2種以上の酵素が、2種以上のプロテアーゼを含むものである請求項1記載の複合酵素粒剤の製造法。

【請求項3】 安定化剤が、ホウ素化合物、無機酸アルカリ土類金属塩、ポリオール、カルボン酸類、ヒダントイン及び尿素から選ばれる1種以上の化合物である請求項1記載の複合酵素粒剤の製造法。

【請求項4】 安定化剤が、ホウ素化合物である請求項1～3のいずれか1項記載の複合酵素粒剤の製造法。

【請求項5】 安定化剤が酵素粉末中に1～10重量%含まれている請求項1～4のいずれか1項記載の複合酵素粒剤の製造法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は2種以上の酵素を一の顆粒中に安定に配合してなる複合酵素粒剤の製造法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】衣料用の洗浄剤には洗浄効果を高める目的でプロテアーゼが広く用いられている。近年、洗浄力を更に高める目的でプロテアーゼの他に、セルラーゼ、リパーゼ、アミラーゼ、前記と異なるプロテアーゼ等の複数の酵素を配合した洗浄剤が上市されている。

【0003】複数の酵素を洗浄剤に配合するには通常、1種の酵素を一の顆粒に配合する方法（すなわち酵素ごとに粒剤を調製する）が採られるが、これを一の粒剤化設備で行うと酵素同士のコンタミ等が懸念されることから粒剤化設備が複数必要となる。また、複数の酵素粒剤を洗浄剤中に配合するには、酵素配合設備も複数必要になることから、設備投資が多大となるという問題があった。

【0004】そこで、複数の酵素を一の粒剤中に配合した複合酵素粒剤が提案されているが、プロテアーゼと他の酵素を混合した場合、プロテアーゼのタンパク分解作用により、タンパク質の一種である他の酵素が分解されてしまうため、充分その機能を発揮しないことがある。これを解決する手段として、粒剤中におけるプロテアーゼと他の酵素との接触を避けるために粒剤の核部分と殻部分とに分けて配合する方法（特開昭61-168698号）や、粒子サイズの異なる酵素顆粒を製造し、大顆粒を小顆粒で凝集封入する方法（特表平9-501840号）等が提案されている。しかしこれらの手法は、煩

雑な造粒法を必要とするため粒剤収率が低下してしまう。

## 【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、プロテアーゼを含む2種以上の酵素を一の粒剤中に安定に効率良く配合してなる複合酵素粒剤の製造法を提供することにある。

## 【0006】

【課題を解決するための手段】そこで本発明者らは、プロテアーゼと他の酵素との併用系において、分解されやすい方の酵素の安定化剤を酵素粉末中に配合して、水溶性粒子を核とし、特定のバイNDERを用いて造粒し、被覆すれば、これらの酵素が一の粒剤中に実質上均質に含まれているにもかかわらず、プロテアーゼによる他の酵素の分解が防止された複合酵素粒剤が得られることを見出した。

【0007】すなわち、本発明は、プロテアーゼを含む2種以上の酵素を含有する1種又は2種以上の酵素粉末であって、少なくとも該プロテアーゼに分解されやすい方の酵素を含む酵素粉末中に該酵素の安定化剤を実質上均質に含有する酵素粉末を、水溶性の粒子を核として、水溶性有機バイNDERを用いて造粒し、次いで水溶性又は水分散性被覆剤で被覆することを特徴とする複合酵素粒剤の製造法を提供するものである。

## 【0008】

【発明の実施の形態】本発明の複合酵素粒剤に配合されるプロテアーゼを含む2種以上の酵素（以下、成分（A）ということがある）としては、プロテアーゼ（A<sup>1</sup>）と、エステラーゼ、カルボヒドラーゼ、リアーゼ及び当該プロテアーゼと異なるプロテアーゼから選ばれる1種以上の酵素（A<sup>2</sup>）との組み合わせが挙げられる。プロテアーゼの具体例としては、ペプシン、トリプシン、キモトリプシン、コラゲナーゼ、ケラチナーゼ、エラスターゼ、ズブチリシン、パパイシン、アミノペプチダーゼ、カルボキシペプチダーゼ等が挙げられる。エステラーゼの具体例としては、ガストリックリパーゼ、パンクレアチックリパーゼ、植物リパーゼ類、ホスホリパーゼ類、コリンエステラーゼ類、ホスファターゼ類等が挙げられる。カルボヒドラーゼとしては、セルラーゼ、マルターゼ、サッカラーゼ、アミラーゼ、ベクチナーゼ、 $\alpha$ -及び $\beta$ -グリコシダーゼ等が挙げられる。リアーゼとしては、カルボキシ脱離酵素、アルデヒド脱離酵素、オキソ酸脱離酵素、ヒドロリアーゼ、多糖に作用する脱離酵素、アンモニアリアーゼ等が挙げられる。

【0009】これらの成分（A）中の（A<sup>1</sup>）と（A<sup>2</sup>）との配合比は、特に限定されないが、重量比で（A<sup>1</sup>）：（A<sup>2</sup>）＝1：1000～1000：1、特に1：100～100：1が好ましい。

【0010】本発明の複合酵素粒剤に配合される安定化剤（以下、成分（B）ということがある）の中には、種

々の酵素それ自体の安定化剤として知られているものもあるが、本発明のようにプロテアーゼによる他の酵素の分解を阻害する効果があることは全く知られていない。成分(B)としては、ホウ素化合物、無機酸アルカリ土類金属塩、ポリオール、カルボン酸類、ヒダントイン及び尿素から選ばれる1種以上が挙げられる。このうち、ホウ素化合物としてはホウ砂、ホウ酸等が挙げられる。無機酸アルカリ土類金属塩としては、カルシウム又はマグネシウムの塩化物、硫酸塩、亜硫酸塩、ケイ酸塩等が挙げられる。

【0011】ポリオールとしてはシュクロース、マンニトール、マルチトール、ソルビトール、トレハロース、グリセリン、プロピレングリコール、多糖類などが挙げられるが、このうちプロピレングリコールが特に好ましい。

【0012】カルボン酸類としては、アミノ酸、炭素数1~20の脂肪酸、ジカルボン酸、ヒドロキシカルボン酸、多糖カルボン酸又はその塩がより好ましい。アミノ酸又はその塩としては、グリシン、バリン、ロイシン、アスパラギン酸、グルタミン酸、アルギニン、フェニルアラニン、システイン酸、セリン、トリプトファン、プロリン、リジン、メチオニン又はこれらの塩が挙げられるが、このうちバリン、フェニルアラニン、ヒスチジン、プロリン、メチオニン又はこれらの塩がより好ましい。他のカルボン酸又はその塩としては具体的には、炭酸、ギ酸、酢酸、プロピオン酸、アジピン酸、コハク酸、マレイン酸、マロン酸、リンゴ酸、クエン酸、アルギン酸又はこれらの塩が挙げられ、このうち、プロピオン酸カルシウム、ギ酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、酢酸マグネシウム、酢酸カルシウム、炭酸カルシウム、アルギン酸カルシウムが特に好ましい。

【0013】これらの成分(B)は、酵素粉末中に、1~10重量%、特に2~7重量%配合するのが、酵素安定性の点から好ましい。

【0014】本発明複合酵素粒剤においては、成分(A)中にプロテアーゼと他の酵素が含まれているにもかかわらず、成分(B)の作用により当該他の酵素の分解が防止される。そのためには、少なくともプロテアーゼ(A<sup>1</sup>)に分解されやすい酵素(A<sup>2</sup>)を含む酵素粉末中に酵素(A<sup>2</sup>)の安定化剤(B)を実質上均質に含まれている必要がある。具体的には、成分(A)と成分(B)とが酵素粉末中に実質上均質に含まれているか、又は成分(A<sup>2</sup>)と成分(B)とが酵素粉末中に実質上均質に含まれていればよい。

【0015】酵素と成分(B)の均質化は、例えば、酵素水溶液に成分(B)及び必要に応じて芒硝などの脱水剤を加え、噴霧乾燥することにより行うのが好ましい。得られた酵素粉末は、核粒子100重量部に対して9~100重量部、特に10~40重量部用いるのが好ましい。

【0016】当該酵素粉末は、水溶性の粒子を核として、水溶性の有機バインダーを用いて造粒し、次いで水溶性又は水分散性被覆剤で被覆される。

【0017】核となる水溶性の粒子としては、用いる酵素によって異なるが、例えば塩化ナトリウム(食塩)、塩化カリウム、芒硝、炭酸ナトリウム、砂糖などの粒子が挙げられる。核粒子の平均粒子径は、0.2~1.2mmが好ましい。かかる核粒子は、本発明複合酵素粒剤中に30~90重量%、特に40~60重量%となるように用いるのが好ましい。

【0018】水溶性有機バインダーとしては、(a)融点が35~80℃のポリエチレングリコール及びその誘導体、ポリオキシエチレン・ポリオキシプロピレン共重合体からなる群より選ばれる水溶性高分子、(b)融点或いは流動点が35~80℃のノニオン性界面活性剤、(c)平均分子量が4000以上のポリカルボン酸塩等の1種或いは2種以上が挙げられる。特に好ましい水溶性有機バインダーとしては、(a)のポリエチレングリコール及びその誘導体として、ポリエチレングリコール、ポリエチレングリコール硫酸、メトキシポリエチレングリコール等が挙げられ、(b)のノニオン性界面活性剤としてはポリオキシエチレンアルキルエーテル等が挙げられ、(c)のポリカルボン酸塩としてはポリアクリル酸、アクリル酸マレイン酸共重合体、ポリアセタールカルボキシレート等のアルカリ金属塩が挙げられる。これらの水溶性有機バインダーは、核粒子100重量部に対して9~60重量部、特に10~20重量部用いるのが好ましい。また、酵素粉末と水溶性有機バインダーの重量比は酵素粉末1に対してバインダー0.2~2の範囲とするのが好ましい。

【0019】本発明においては、更に必要に応じて粉末状の増量剤を添加することができる。増量剤としてはタルク、酸化チタン、ゼオライト、活性白土、カオリン、ケイソウ土、ベントナイト、パーライト、酸性白土等が挙げられる。

【0020】造粒手段としては乾式造粒が好ましく、造粒方法としては押し出し造粒、転動造粒、解砕造粒、流動層造粒、噴霧造粒、破砕造粒等が挙げられる。このうち、転動造粒法、特に攪拌転動造粒法が好ましい。攪拌転動造粒機的具体例としては、ヘンシェルミキサー(三井三池化工機(株))、ハイスピードミキサー(深江工業(株))、バーチカルグラニュレーター(富士産業(株))等を挙げることができる。これらの共通点は、堅形の混合槽内部に攪拌羽根を取付けた垂直な攪拌軸を持つことである。水平の攪拌軸を有する模型の造粒機であるレディゲ・ミキサー(レディゲ社)もまた同様に用いることができる。

【0021】得られた造粒物の被覆に用いられる水溶性又は水分散性被覆剤としては、特に制限されないが、ポリエチレングリコール、ポリアクリル酸塩、ポリビニル

アルコール、ポリビニルピロリドン、セルロース誘導体、デンプン誘導体等の融点が35～80℃の水溶性被膜形成ポリマー；これらのポリマーとタルク、クレー、酸化チタン、炭酸カルシウム等の水溶性又は難溶性無機粒子又はアルカリ金属ケイ酸塩、アルカリ金属炭酸塩等の保護剤等との組み合わせが挙げられる。被覆剤は造粒物に対し重量比で0.01～0.7、特に0.05～0.6の割合で用いるのが好ましい。

【0022】造粒物の被覆方法としては、流動層造粒機、コーティングパン式造粒機、攪拌造粒機等の装置により常法により被覆する方法が挙げられる。

【0023】かくして得られた複合酵素粒剤の粒径は特に制限されないが、平均粒径として200～3000 $\mu$ m、特に350～1500 $\mu$ mが好ましい。

【0024】本発明粒剤は、洗浄剤組成物の配合成分として有用であり、これを配合した洗浄剤組成物は、衣料用、食器用、住居用等の洗浄剤として使用することができる。

【0025】

【実施例】実施例1

(1) 酵素粉末の調製

酵素粉末1

アルカリプロテアーゼ（プロテアーゼK、Bacillus sp. KSM-16 (FERM P11418) 由来）の水溶液に芒硝を添加し、並流式噴霧乾燥機で乾燥しプロテアーゼK含有酵素粉末1を得た。乾燥粉末中の芒硝の含有

量は、17%である。

酵素粉末2

アルカリプロテアーゼ（プロテアーゼT、Bacillus sp. KSM-KP43 (FERM P-15863) 由来）の水溶液に芒硝を添加し、並流式噴霧乾燥機で乾燥しプロテアーゼT含有酵素粉末2を得た。乾燥粉末中の芒硝の含有量は、10%である。

酵素粉末3

アルカリプロテアーゼ（プロテアーゼT）の水溶液に芒硝とホウ砂を添加し、並流式噴霧乾燥機で乾燥しプロテアーゼT含有酵素粉末3を得た。乾燥粉末中の芒硝及びホウ砂の含有量は、各々5%である。

(2) 複合酵素粒剤の調製

下記組成の原料（コート剤を除いた合計3kg）をハイスピードミキサー（深江工業（株）、FS-5J型）に全て投入し、ジャケットに70℃の温水を流しながら、アジテーター360r/min、チョッパー900rpmで攪拌混合を行い、内容物を65℃まで上昇させた。その後、ジャケットに40℃の温水を流し内容物が50℃まで冷却されたところでコート剤（合計90g）を投入し複合酵素粒剤A及びBを得た。複合酵素粒剤A及びBの回収率は350 $\mu$ m以上1000 $\mu$ m以下が98%以上であった。

【0026】

【表1】

		複合酵素粒剤A	複合酵素粒剤B
酵素粉末1	平均粒径；30 $\mu$ m	8.2	8.2
酵素粉末2	平均粒径；30 $\mu$ m	9.9	—
酵素粉末3	平均粒径；30 $\mu$ m	—	8.9
食塩	平均粒径；610 $\mu$ m 500 $\mu$ m以下；72.0重量% 700 $\mu$ m以上；9.0重量%	55.0	55.0
酸化チタン	平均粒径；0.27 $\mu$ m	7.0	7.0
PEG6000	花王（株）製	7.0	7.0
芒硝	平均粒径；16.0 $\mu$ m	12.9	13.8
小計		100.0	100.0
コート剤			
シアニンブルー		0.1	0.1
熔融PEG6000		2.9	2.9
小計		3.0	3.0
合計		103.0	103.0

PEG6000：ポリエチレングリコール（平均分子量6000）

【0027】得られた複合酵素粒剤A及びBを40℃、相対湿度80%の条件下に保存し保存安定性を調べた。結果を表2に示す。表2よりホウ砂を配合した複合酵素

粒剤Bは保存安定性が優れていることがわかる。

【0028】

【表2】

	残存TS43相対活性 (%) 40℃/80%RT				
保存日数	0日	6日	12日	21日	27日
複合酵素粒剤A	100	95	77	78	78
複合酵素粒剤B	100	96	88	87	87

## 【0029】実施例2

## (1) 酵素粉末の調製

## 酵素粉末4

芒硝を酵素水溶液の固形分100重量部に対し21重量部添加したアルカリプロテアーゼ（プロテアーゼK）の水溶液と、芒硝を酵素水溶液の固形分100重量部に対し13重量部添加したアルカリプロテアーゼ（プロテアーゼT）の水溶液とを連続混合しながら並流式噴霧乾燥機で乾燥し酵素粉末4を得た。

## 酵素粉末5

芒硝を酵素水溶液の固形分100重量部に対し21重量部添加したアルカリプロテアーゼ（プロテアーゼK）の水溶液と、芒硝とホウ砂を各々酵素水溶液の固形分10

0重量部に対し8.5重量部、4.1重量部添加したアルカリプロテアーゼ（プロテアーゼT）の水溶液とを連続混合しながら並流式噴霧乾燥機で乾燥し酵素粉末5を得た。

## (2) 複合酵素粒剤の調製

下記組成の原料（コート剤を除いた合計3kg）をハイスピードミキサー（深江工業（株）、FS-5J型）に全て投入し実施例1と同様に複合酵素粒剤を得た。複合酵素粒剤C及びDの回収率は350 $\mu$ m以上1000 $\mu$ m以下が98%以上であった。

## 【0030】

## 【表3】

		複合酵素粒剤C	複合酵素粒剤D
酵素粉末4	平均粒径; 30 $\mu$ m	16.8	—
酵素粉末5	平均粒径; 30 $\mu$ m	—	17.1
食塩	平均粒径; 610 $\mu$ m	55.0	55.0
	500 $\mu$ m以下; 72.0重量%		
	700 $\mu$ m以上; 9.0重量%		
酸化チタン	平均粒径; 0.27 $\mu$ m	7.0	7.0
PEG6000	花王（株）製	7.5	7.5
芒硝	平均粒径; 16.0 $\mu$ m	13.7	13.4
小計		100.0	100.0
コート剤			
シアニンブルー		0.1	0.1
溶融PEG600		2.9	2.9
小計		3.0	3.0
合計		103.0	103.0

【0031】得られた複合酵素粒剤C及びDを40℃、相対湿度80%の条件下に保存し保存安定性を調べた。結果を表4に示す。表4よりホウ砂を配合した複合酵素

粒剤Dは保存安定性が優れていることがわかる。

## 【0032】

## 【表4】

	残存TS43相対活性 (%) 40℃/80%RT			
保存日数	0日	5日	12日	22日
複合酵素粒剤C	100	89	82	75
複合酵素粒剤D	100	95	86	86

## 【0033】実施例3

実施例1及び2と同様にして、2種のプロテアーゼを配合した複合酵素粒剤を調製し、その残存活性を調べたと

ころ、バリン、フェニルアラニン、トリプトファン、プロリン、メチオニン、ヒダントイン、尿素、プロピオン酸ナトリウム、プロピオン酸カルシウム、ギ酸ナトリウ

ム、酢酸ナトリウム、酢酸マグネシウム、塩化マグネシウム、硫酸カルシウム、酢酸カルシウム、炭酸カルシウム、塩化カルシウム、ホウ酸、アルギン酸カルシウム、及びプロピレングリコールに極めて優れたプロテアーゼによる酵素の分解防止効果が認められた。

【0034】

【発明の効果】本発明方法により得られた複合酵素粒剤は、プロテアーゼを含む2種以上の酵素を含有するにもかかわらず、これらの酵素が失活せず長期間安定である。

---

フロントページの続き

(72)発明者 宇治田 吾朗  
茨城県鹿島郡神栖町東深芝20 花王株式会社  
社研究所内

Fターム(参考) 4B050 CC07 CC08 DD02 JJ02 KK01  
KK05 KK06 KK11 KK12  
4H003 BA09 CA21 DA01 DA05 DA17  
EA15 EA18 EA19 EA21 EA25  
EB36 EB41 EC02 FA16